

ANTI-APOPTOTISCH WIRKSAME APTAMERE

Die vorliegende Erfindung betrifft anti-apoptotisch wirksame Aptamere. Die entsprechenden Sequenzen werden gezeigt. Mögliche therapeutische und diagnostische Verwendungen werden beschrieben.

Nukleinsäuremoleküle (sogenannte Aptamere), die spezifisch an
5 bestimmte Zielmoleküle (Antigene) binden, sowie Verfahren zur Herstellung und Isolierung solcher Aptamere wurden im Stand der Technik bereits sehr ausführlich beschrieben.

Solche aus einzelsträngiger ssDNA oder ssRNA bestehenden Aptamere besitzen dabei sehr hohe Affinitäten und Spezifitäten für die entsprechenden
10 Antigene. Bis heute wurden Nukleinsäureliganden für Metallionen, organische Verbindungen, Peptide, Proteine, oder sogar komplexe Strukturen wie Viren und Zellen isoliert (Übersichtsartikel: Gold *et al.*, Annu. Rev. Biochem. 64, (1995), 763-797; Ellington und Conrad, Biotechnol. Annu. Rev. 1 (1995), 185-214; Famulok, Curr. Opin. Struct. Biol. 9 (1999), 324-329).

15 Aptamere sind daher Nukleinsäuren, bestehend aus DNA oder RNA, die durch ihre räumliche Struktur in der Lage sind, spezifisch und mit hoher Affinität an ein bestimmtes Target zu binden (Osborne, S. E. and A. D. Ellington (1997) "Nucleic Acid Selection and the Challenge of Combinatorial Chemistry" Chem. Rev 97(2): 349-370). In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Aptameren
20 gegen medizinisch relevante Zielproteine identifiziert, und es wird erwartet, dass der Einsatz von Nukleinsäuren für therapeutische und diagnostische Zwecke jetzt erst richtig beginnt (Jayasena, S. D., (1999), "Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics" Clin Chem 45(9): 1628-1650, Cerchia, L., J. Hamm, *et al.*, (2002), "Nucleic acid aptamers in cancer medicine"
25 FEBS Lett 528(1-3): 12-16). Diese neue Entwicklung liegt darin begründet, dass die Identifizierung und Anwendung von DNA oder RNA-Molekülen einige Vorteile gegenüber Antikörpern aufweist, die Therapie- und Diagnose auf vielen Gebieten bisher noch dominieren.

Die Methodik zur Gewinnung monoklonaler Antikörper (Köhler, G. and
30 C. Milstein (1975) "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity" Nature 256 (5517): 495-497) bedeutete einen großen Durchbruch für viele Bereiche der modernen Biologie und Medizin. In der

medizinischen Forschung sind sie vor allem auf diagnostischem Gebiet von Bedeutung, inzwischen sind einzelne Antikörper auch als Medikamente zugelassen worden. Wenn ein bestimmtes Protein, z.B. an der Zelloberfläche, als Target für diagnostische oder therapeutische Zwecke identifiziert wurde und dann

5 a) seine Präsenz diagnostisch nachgewiesen, oder b) seine Funktion therapeutisch blockiert werden sollte, so war bisher für beide Fälle die Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers die wichtigste und/oder die schnellste Methode; die Entwicklung niedermolekularer Therapeutika ist immer noch sehr langwierig. Die Nachteile und Einschränkungen bei der Identifizierung und Produktion der

10 Antikörper sind allerdings bekannt (Jayasena 1999), z.B. die Notwendigkeit, mit Tierversuchen die erste Immunisierung durchzuführen; das Problem der Verfügbarkeit und Reproduzierbarkeit der Hybridoma-Zellen über mehrere Jahre; oder der hohe Aufwand und die enormen Kosten bei der Herstellung der Antikörper.

15 Ein Aptamer kann unter spezifisch ausgewählten Versuchsbedingungen selektiert werden, wie z.B. solche, die für ein diagnostisches Verfahren optimal sind (Jayasena 1999). Aptamere können besser über längere Zeit gelagert werden, da sie nicht wie Proteine einer irreversiblen Denaturierung unterliegen, sondern jederzeit wieder thermisch renaturiert werden können. Aptamere werden während

20 des Selektionsverfahrens meist enzymatisch synthetisiert, sie lassen sich für eine Produktion im größeren Maßstab aber auch chemisch synthetisieren, so dass die Herstellung gegenüber der Produktion von monoklonalen Antikörpern erheblich besser reproduzierbar erfolgen kann (Jayasena 1999).

Die Modifizierungen, die zur Stabilisierung von DNA (Agrawal, S. (1996)

25 "Antisense oligonucleotides: towards clinical trials" Trends Biotechnol 14(10): 376-387) oder RNA (Pieken, W. A., Olsen D. B. *et al.* (1991). "Kinetic characterization of ribonuclease-resistant 2'-modified hammerhead ribozymes." Science 253(5017): 314-317; Ruckman, J., Green L. S., *et al.* (1998) "2'-Fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular

30 endothelial growth factor (VEGF165). Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain." J Biol Chem 273(32): 20556-20567) führen, sind als Routineverfahren

in der Synthese der Nukleinsäuren bzw. ihrer Nukleotid-Vorstufen etabliert, so dass jetzt die ersten Aptamere in klinischen Studien getestet werden können (Eyetechn Study Group (2002) "Preclinical and phase 1A clinical evaluation of an anti-VEGF pegylated aptamer (EYE001) for the treatment of exudative age-related macular degeneration" Retina 22(2): 143-152).

Die Apoptose ist ein genetisch kodierte Selbstmordprogramm, welches in eukaryontischen Zellen unter bestimmten physiologischen oder pathologischen Bedingungen induziert wird. Die Induktion der Apoptose muss außerordentlich präzise reguliert sein, denn eine Hyperaktivität kann zu degenerativen Erkrankungen führen. Auf der anderen Seite kann eine verringerte Apoptose-Induktion beispielsweise zur Tumorprogression beitragen.

Verschiedene niedermolekulare Induktoren der Apoptose wurden bereits beschrieben. Eine wichtige Klasse sind Tumorzystostatika. Auf welche Weise diese Zytostatika oder andere Substanzen Apoptose induzieren können, ist in den meisten Fällen jedoch unbekannt.

Die Induktion von Apoptose kann beispielsweise über eine Reihe von sog. Todesrezeptoren, d. h. Rezeptoren, die eine "Death Domain" (DD) enthalten, wie CD95, TNF-RI, DR3, DR4 oder DR5, erfolgen, die nach Bindung ihrer Liganden Apoptose-Signalwege induzieren. Beispielsweise interagiert nach Bindung des CD95-Liganden der CD95-Rezeptor mit dem Adapterprotein FADD/MORT1, wodurch das "Recruitment" und die Aktivierung der Protease FLICE/Caspase-8, am DISC "Death Inducing Signalling Complex" induziert werden. FADD und FLICE enthalten jeweils "Death Effector Domains" (DED). Die Induktion der Apoptose über diese Apoptose-Signalwege ist von außen beispielsweise durch die Gabe von Zellgiften (cytotoxischen Substanzen), Bestrahlung, Viren, Entzug von Wachstumsfaktoren oder mechanische Zellverletzung möglich. Diese Möglichkeiten der Apoptose-Induktion sind allerdings von bestimmten Nachteilen begleitet. So führt die Gabe von Zellgiften, wie Cytostatika, oder die Bestrahlung bei Krebszellen zur Resistenzentwicklung und darüber hinaus zu einer Schädigung normaler Zellen, bei denen eigentlich keine Apoptose ausgelöst werden sollte.

Im allgemeinen wird z.B. die Induktion der Apoptose vorgeschlagen zur Behandlung von Krebs, zur Verhinderung von angiogenetischen Vorgängen etc. Obwohl hier bereits Induktoren beschrieben wurden, weisen diese noch immer eine Reihe von Nachteilen auf. Beispielsweise erzeugen Zytostatika schwere
5 Nebenwirkungen.

Es werden aber auch pathologische Zustände diskutiert, bei denen die Apoptose negative Auswirkungen hat, und zu deren Behandlung die Apoptose inhibiert werden muß.

Ein Beispiel für eine solche Krankheit ist die Arteriosklerose.

10 Insbesondere konnte von den Erfindern schon früher gezeigt werden, dass gerade im Bereich der arteriosklerotischen Plaques apoptotische Zellen (besonders: Endothelzellen, glatte Muskelzellen) auftreten, und dass dieses Auftreten durch gestörte Strömungsverhältnisse verstärkt wird, also strömungsabhängig ist (Freyberg *et al.*, BBRC, 286, 141-149, 2001).

15 Auch können solche Substanzen, die die Apoptose modulieren eingesetzt werden, um die Heilung von Wunden positiv zu beeinflussen. Weitere Krankheiten, die in Zusammenhang mit einer verstärkt auftretenden Apoptose diskutiert werden, sind AIDS, Krebs und Alzheimer. Weiterhin in Zusammenhang mit einer verstärkt auftretenden Apoptose diskutierte Erkrankungen sind
20 systemischer Lupus erythematosus sowie die rheumatoide Arthritis sowie weitere chronisch-entzündliche Erkrankungen.

Es besteht daher ein hoher Bedarf an Substanzen, die die Apoptose positiv oder negativ beeinflussen. Im Sinne der vorliegenden Erfindung sind insbesondere solche Substanzen bevorzugt, die Apoptose inhibieren. Insbesondere
25 wäre es günstig, die strömungsabhängige/kraftabhängige und mit der Arteriosklerose/Wundheilung ursächlich verbundene Apoptose inhibieren zu können. Weiterhin besteht hoher Bedarf an pharmazeutischen Formulierungen, die solche Substanzen enthalten, und die zur Behandlung von Zuständen eingesetzt werden können, bei denen die Inhibition oder die Induktion der
30 Apoptose angezeigt ist, insbesondere zur Behandlung der Arteriosklerose, die positive Beeinflussung der Wundheilung, aber auch von AIDS, Alzheimer und Krebs.

In der älteren Deutschen Patentanmeldung DE 101 63 130 offenbaren die Erfinder der vorliegenden Erfindung Peptide, die Apoptose inhibieren oder induzieren.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, weiter verbesserte
5 apoptotisch wirksame Substanzen zur Verfügung zu stellen. Insbesondere war es eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Substanzen zur Verfügung zu stellen, die eine durch TSP-1 induzierte Apoptose von eukaryotischen Zellen, insbesondere von Endothelzellen und Fibroblasten inhibieren können. Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, pharmazeutische
10 Zubereitungen zur Verfügung zu stellen, mit denen Krankheiten wie Arteriosklerose, Wunden, AIDS, Alzheimer, Krebs, systemischer Lupus erythematosus sowie die rheumatoide Arthritis sowie weitere chronisch-entzündliche Erkrankungen behandelt werden können, bei denen die Inhibition oder Induktion von Apoptose angezeigt ist.

15 Diese und weitere, nicht explizit genannte Aufgaben, die sich aber aus der vorangegangenen Würdigung des Stands der Technik ohne weiteres ergeben, werden durch die in den Ansprüchen definierten Ausführungsbeispiele der vorliegenden Erfindung gelöst.

Überraschenderweise kann diese Aufgabe in einfacher Weise gelöst
20 werden durch zur Verfügung stellen einer Nukleinsäure umfassend eine Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den in den SEQ ID NOs 1 bis 9 dargestellten Sequenzen.

Ein weiteres Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung betrifft funktionelle Varianten dieser Nukleinsäuren. Damit sind für die Zwecke der
25 vorliegenden Erfindung Nukleinsäuren gemeint, die einen Bereich von mindestens 6, bevorzugt mindestens 10, ganz besonders bevorzugt mindestens 15 und am meisten bevorzugt mindestens 20 aufeinanderfolgenden Nukleotiden aufweisen, der mindestens 60% bevorzugt mindestens 70%, besonders bevorzugt mindestens 80%, noch mehr bevorzugt mindestens 90% und ganz besonders
30 bevorzugt mindestens 95% Sequenzidentität zu den Sequenzen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: SEQ ID NO 1 bis SEQ ID NO 9 aufweisen, und in dem unten beschriebenen Testverfahren eine anti-apoptotische Aktivität von

mindestens 50% Inhibitionsindex, bevorzugt mindestens 60%, besonders bevorzugt mindestens 70%, ganz besonders bevorzugt mindestens 80%, noch mehr bevorzugt mindestens 90% und am meisten bevorzugt mindestens 95% aufweisen.

- 5 Ein weiteres Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung betrifft Nukleinsäuren bei denen sich an eine Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: SEQ ID NO 1 bis SEQ ID NO 9 in 5'- und/oder 3'- Richtung Nukleotide anschliessen. Insbesondere umfasst diese Verlängerung jeweils nicht mehr als 100, bevorzugt nicht mehr als 70, besonders bevorzugt
10 nicht mehr als 30, ganz besonders bevorzugt nicht mehr als 20, und am meisten bevorzugt nicht mehr als 10 Nukleotide.

Selbstverständlich sind auch hier funktionelle Varianten dieser verlängerten Nukleinsäuren im Sinne der obigen Definition mitumfasst.

- Die Aptamere der vorliegenden Erfindung umfassen vorzugsweise
15 Modifikationen, die die Stabilität der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren gegenüber einem Nuklease-Abbau erhöhen. Bevorzugt handelt es sich dabei um die Verwendung von 2'-NH₂-2'-desoxyuridin und/oder 2'-NH₂-2'-desoxycytidin anstelle der unmodifizierten Nukleotide Uridin und Cytidin.

- Unter Nukleinsäuren werden für die Zwecke der vorliegenden Erfindung
20 polymere Moleküle verstanden, die im Falle der RNA aus den Nukleotiden Adenosin (A), Cytidin (C), Uridin (U), Guanosin (G) und die im Falle der DNA aus Desoxyadenosin (A), Desoxycytidin (C), Desoxyguanosin (G) und Thymidin (T) aufgebaut sind. Diese Nukleotide können mindestens eine der folgenden Modifikationen aufweisen: 2'-desoxy, 2'-Fluor, 2'-Chlor, 2'-Brom, 2'-Iod, 2'-
25 Amino (bevorzugt nicht substituiert, mono- oder di-substituiert), 2'-mono-, di- oder tri-halomethyl, 2'-O-Alkyl, 2'-O-halo-substituiertes Alkyl, 2'-Alkyl, Azido, Phosphorothioat, Sulfhydryl, Methylphosphonat, Fluorescein, Rhodamin, Pyren, Biotin, Xanthin, Hypoxanthin, 2,6-Diaminopurin, 2-Hydroxy-6-mercaptopurin, Polyethylenglykol-Modifikationen und bei Pyrimidin-Basen an 6-Position
30 Schwefel bzw. an 5-Position Halogen, C₁₋₅ Alkylgruppen, abasischer Linker, 3'-desoxy-adenosin oder andere "Kettenterminatoren" bzw. nicht-verlängerbare Nukleotidanalogue am 3'Ende oder andere Modifizierungen am 5'- oder/und 3'-

Ende aufweisen. Weitere im Stand der Technik bereits offenbarte Modifikationen wie z.B. in der WO 02/26932 sind hier selbstverständlich mit umfasst.

Im allgemeinen umfassen Aptamere 10 bis 100 Nukleotide, vorzugsweise 15 bis 50 Nukleotide, besonders bevorzugt 20 bis 40 Nukleotide. Gegebenenfalls
5 können Aptamere eine Minimalsequenz von etwa mindestens 6, bevorzugt etwa mindestens 10 und besonders bevorzugt mindestens 14 bis 15 Nukleotiden aufweisen, die nötig ist, um die Bindung zu gewährleisten.

Ein bevorzugtes Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung stellen pharmazeutische Zubereitungen umfassend mindestens eine erfindungsgemäße
10 Nukleinsäure dar.

Ein insbesondere bevorzugtes Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren zur Herstellung eines Medikamentes zur Behandlung von Arteriosklerose, zur Förderung der Wundheilung, insbesondere bei schwerheilenden Wunden, AIDS,
15 Krebs, Alzheimers Erkrankung, systemischer Lupus erythematosus sowie die rheumatoide Arthritis und weiterer chronisch-entzündlicher Erkrankungen mittels der im Fachgebiet gut bekannten Methoden.

In einem weiteren bevorzugten Ausführungsbeispiel betrifft die vorliegende Erfindung auch die Verwendung der erfindungsgemäßen
20 Nukleinsäuren als Diagnosetool. Dabei werden markierte Nukleinsäuren verwendet. Die Markierung kann z.B. aus einem Fluoreszenzfarbstoff, einem Enzym, Antikörper oder einem Radionuklid bestehen. Die entsprechenden Nachweismethoden sind dem Fachmann bestens bekannt.

Vorzugsweise wird ein erfindungsgemäßes Aptamer dann als Bestandteil
25 eines kit of parts vorliegen nebst beispielsweise Positiv- und Negativkontrollen. Es ist dem Fachmann klar, daß die entsprechenden Aptamere insgesamt prinzipiell wie Antikörper z.B. in ELISA-Applikationen, chromatographischen Verfahren und für diagnostische/Screening-Verfahren angewendet werden können.

30 Anti-apoptotisch wirksam im Sinne der vorliegenden Erfindung bedeutet, dass die entsprechende Substanz in dem Inhibitionstest gemäß Beispiel 6 einen

Inhibitions-Index von mindestens 50%, bevorzugt mindestens 60%, besonders bevorzugt mindestens 70%, ganz besonders bevorzugt mindestens 80%, noch mehr bevorzugt mindestens 90% und am meisten bevorzugt mindestens 95% bezogen auf die Kontrolle mit TSP-1-induzierter Apoptose bewirkt.

- 5 Aptamere, die aktive Bestandteile einer pharmazeutischen Zubereitung sind, werden im Allgemeinen in einem pharmazeutisch annehmbaren Träger gelöst. Beispiele für pharmazeutisch annehmbare Träger können Pufferlösungen wie Phosphatpuffer oder Citratpuffer sein.

- Die spezifische Dosierung und Posologie ist für jeden Patienten von einer
10 Anzahl von Faktoren abhängig, einschließlich der Aktivität der verwendeten spezifischen Verbindungen, dem Alter des Patienten, dem Körpergewicht, dem allgemeinen Gesundheitszustand, dem Geschlecht, der Ernährung, der Zeit der Verabreichung, dem Weg der Verabreichung, der Exkretionsrate, der Verbindung mit anderen Arzneimitteln und der Schwere der einzelnen Erkrankung, für die die
15 Therapie angewandt wird. Sie wird von einem Arzt in Abhängigkeit von diesen Faktoren ermittelt.

- Aptamermedikamente werden üblicherweise parenteral verabreicht, z.B. durch ein Inhalationsspray, rektal, durch subkutane, intravenöse, intramuskuläre, intraartikuläre und intrathecale Injektions- und Infusionstechniken, oder äußerlich
20 in pharmazeutischen Formulierungen, welche konventionelle, pharmazeutisch annehmbare Träger, Adjuvantien und Vehikel enthalten. Je nach Art der identifizierten Substanz kommen auch andere Verabreichungswege in Betracht, z.B. oral. Weiterhin kann das Medikament als Salbe, Gel, feuchter Verband etc. aufgebracht werden.

- 25 Die Erfindung stellt ebenso pharmazeutische Zusammensetzungen bereit, die eine wirksame Menge eines anti-apoptotischen wirksamen Aptamers in Kombination mit einem konventionellen pharmazeutischen Träger umfassen. Ein pharmazeutischer Träger ist z.B. ein fester oder flüssiger Füllstoff, ein Verkapselungsmaterial oder ein Lösungsmittel. Beispiele für Materialien, die als
30 pharmazeutische Träger dienen können, sind Zucker wie Lactose, Glucose und Saccharose; Stärke wie Maisstärke und Kartoffelstärke; Cellulose und deren Derivate wie Natriumcarboxymethylcellulose, Ethylcellulose und Celluloseacetat;

pulverisierter Tragacanth; Malz; Gelatine; Talg; Arzneimittelträger wie Kakaobutter und Zäpfchenwachse; Öle wie Erdnussöl, Baumwollsaamenöl, Färberdistelöl, Sesamöl, Olivenöl, Maisöl und Sojabohnenöl; Polyole wie Propylenglykol, Glycerin, Sorbitol, Mannitol und Polyethylenglykol; Ester wie
5 Ethyloleat und Ethyllaureat; Agar; Puffermittel wie Magnesiumhydroxid und Aluminiumhydroxid; Alginsäure; Pyrogen-freies Wasser; isotonische Salzlösung; Ringers Lösung, Ethylalkohol und Phosphatpufferlösungen wie auch andere nichttoxische kompatible Substanzen, die in pharmazeutischen Formulierungen verwendet werden. Benetzungsmittel, Emulgatoren und Gleitmittel wie
10 Natriumlaurylsulfat und Magnesiumstearat, wie auch Färbemittel, Beschichtungsmittel sowie Parfümierungsmittel und Konservierungsstoffe können ebenso in den Zubereitungen vorhanden sein, entsprechend den Anforderungen des Galenikers. Die Menge des aktiven Wirkstoffes, der mit den Trägermaterialien kombiniert wird, um eine Einzeldosis zu produzieren, wird
15 abhängig von dem behandelten Patienten und der speziellen Methode der Verabreichung variieren.

Pharmazeutisch annehmbare Salze der erfindungsgemäßen Aptamere können auf gut bekanntem Weg, beispielsweise durch Lösen der erfindungsgemäßen Verbindungen in der entsprechenden wässrigen
20 Pufferlösungen oder H₂O und anschließendem Gefriertrocknen hergestellt werden. Metallsalze können erhalten werden durch Lösen der erfindungsgemäßen Verbindungen in Lösungen, die das entsprechende Ion enthalten, und anschließend Isolieren der Verbindung über HPLC oder Gelpermeationsverfahren.

25 Weitere Verfahren und Methoden zur Herstellung von Aptamermedikamenten sowie deren Verabreichung sind z.B. in der WO 02/26932 offenbart, und können selbstverständlich hier ebenfalls angewendet werden.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können in einfacher Weise beispielsweise durch herkömmliche chemische Synthese mithilfe eines
30 DNA/RNA-Synthesizer hergestellt werden, ohne den Fachmann vor irgendwelche Probleme zu stellen. Die entsprechenden Protokolle und Geräte sind auf dem Fachgebiet bestens bekannt und Routine.

Figur 1 zeigt eine für SEQ ID NO 2 postulierte Sekundärstruktur. Das Aptamer SEQ ID NO 2 bildet mit der RNA-Sequenz 5'-CGGAC GGGAC CAGAG GUGCC GCUGU CCG-3' die Struktur H1 aus. Dieser Bereich mit Helix-(Hairpin)-Struktur (H1) ist flankiert von zwei RNA-Abschnitten, die ebenfalls eine Helix-Struktur ausbilden können, genannt "Helix F". Die Synthese von veränderten/mutierten RNAs ausgehend von Aptamer 89 (SEQ ID NO 2) zeigt, ob die flankierenden Sequenzen, die die Helix F ausbilden, wichtig für die Funktion des Aptamers sind und ob das Aptamer 89 verkürzt werden kann, bei Erhalt seiner Funktion (SEQ ID NO 4, Beispiel 7).

Figur 2 zeigt eine für SEQ ID NO 7 errechnete Sekundärstruktur. Die Struktur weist im zentralen Bereich der Sequenz (SEQ ID NO 9) einen Hairpin Loop (H2) auf, der durch eine weitere Helix aus den flankierenden Sequenzen ergänzt wird.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die vorliegende Erfindung, ohne jedoch einschränkend zu sein.

BEISPIELE

Die folgende Übersicht zeigt die verwendeten Materialien und Bezugsquellen:

<u>Material</u>	<u>Firma, Ort</u>	<u>Best.-Nr</u>	<u>Bemerkung</u>
Phenol	Carl Roth, Karlsruhe	0038.1	TE-äquilibriert
T7-RNA Polymerase	MBI-Fermentas, St. Leon-Roth	EP0111	
ATP, GTP	Carl Roth, Karlsruhe	K045.1 K047.1	
2'-NH ₂ -UTP 2'-NH ₂ -CTP	tebu-bio, Offenbach	N-1027 N-1026	Hersteller: TriLink, San Diego
RQ1 DNase I, RNase frei	Promega, Mannheim	M6101	
Chemikalien,	Carl Roth, Karlsruhe		

Biochemikalien

Merck, Darmstadt;

Sigma, Deisenhofen

Bidestilliertes Wasser zum Ansetzen von Lösungen wurde mit

- 5 Diethylpyrocarbonat (DEPC), 0,01 % für 24 Stunden bei 20 bis 25°C behandelt und anschließend für 60 min bei 121°C autoklaviert.

Lösungen:

- | | |
|----------|---|
| CI | Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung 24:1 (Volumen/Volumen) |
| 10 1xTBE | 90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA |

Beispiel 1: Synthese der erfindungsgemäßen Aptamere

- Aptamer bezeichnet eine modifizierte RNA, bei der die Pyrimidin-
- 15 Nukleotide (U und C) an der 2'-Position statt der OH-Gruppe eine NH₂- (Amino-) Gruppe tragen. Die Synthese der modifizierten RNA erfolgt hier enzymatisch mittels einer RNA Polymerase durch Einbau von unmodifizierten Purin- und modifizierten Pyrimidin-Nukleotiden.

- Ausgehend von doppelsträngiger DNA (60-70 pmol DNA), die die T7
- 20 Promotor-Sequenz des Bakteriophagen T7 und, ab dem ersten transkribierten Nukleotid eine DNA-Kopie der gewünschten Aptamer-RNA (z.B. für Aptamer Nr. 89: DNA-Sequenz "SEQ ID NO 1", beginnend mit 5'-GGGAGAC...-3', siehe **Beispiel 2**) enthält, werden die Aptamer-RNAs durch die T7 RNA Polymerase synthetisiert. Die Transkription erfolgt in Gegenwart von ATP und GTP sowie der
- 25 modifizierten Nukleotide 2'-NH₂-UTP (2'-NH₂-2'-desoxyuridin) und 2'-NH₂-CTP (2'-NH₂-2'-desoxycytidin) durch Inkubation mit der käuflichen T7 RNA Polymerase in Gegenwart der vom Hersteller empfohlenen Puffer- und Salzbedingungen (Hersteller MBI-Fermentas, St. Leon-Roth) in einem Volumen von 40 µl bei 16°C +/- 3 °C für 20 bis 44 Stunden. Dann wird die noch
- 30 vorhandene DNA durch Zusatz von MgCl₂ (Erhöhung der Konzentration um 2,74 mM) und RNase-freier DNase I (Endkonzentration 0,06 units/µl) und Inkubation bei 37°C für 135 min verdaut, wobei 1 unit DNase I definiert ist als die

Enzymmenge, die 1 µg DNA in 50 µl in Puffer mit 40 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 6 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂, (pH 7,9 bei 25°C), in 10 Minuten bei 37°C komplett verdaut.

Nach Zugabe von 45 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 7,8) wird die Lösung zunächst mit Phenol und dann mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Danach wird die Aptamer-RNA mit Ethanol gefällt und nach Waschen mit 70 % Ethanol in 30 µl DEPC-behandeltem bidestilliertem H₂O gelöst und bei -20°C aufbewahrt. Die Ausbeute an Aptamer-RNA wird durch Analyse der Extinktion bei 260 und 280 nm, sowie zusammen mit Nukleinsäuren bekannter Konzentration, nach Trennung in einem Polyacrylamid-Gel in Gegenwart von 8 M Harnstoff und Tris-Borsäure-Puffer mit 9,47 % (w/v) Acrylamid und 0,53 % Bis-Acrylamid, 8 M Harnstoff und TBE-Puffer (Standard 1xTBE-Puffersystem: 90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA) bestimmt, die Trennung der Nukleinsäuren erfolgte bei 12 bis 16 V/cm für 35 bis 45 min. Das Gel wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBRGreen II (Molecular Probes; Konzentration nach Herstellerangabe) für 20 min angefärbt, mit UV-Licht angeregt und die Fluoreszenz im sichtbaren Licht analysiert.

Beispiel 2: Sequenzen der erfindungsgemäßen Aptamere

1.) Sequenz der DNA Nr. 89 (SEQ ID NO 1)

5' -GGGAG ACGAT ATTCG TCCAT CACCG GACGG GACCA GAGGT
GCCGC TGTCC GACTG AATTC TCGAC C-3'

2.) RNA-Sequenz des Pyrimidin-modifizierten Aptamers Nr. 89 (SEQ ID NO 2)

(U = 2'-NH₂-2'-desoxyuridin; C = 2'-NH₂-2'-desoxycytidin)

5' -GGGAG ACGAU AUUCG UCAU CACCG GACGG GACCA GAGGU
GCCGC UGUCC GACUG AAUUC UCGAC C-3'

3.) RNA-Sequenz des Kernbereichs des Pyrimidin-modifizierten Aptamers Nr. 89 ohne flankierende Sequenzen (SEQ ID NO 3)

(U = 2'-NH₂-2'-desoxyuridin; C = 2'-NH₂-2'-desoxycytidin)

5' -ACCGG ACGGG ACCAG AGGUG C-3'

4.) RNA-Sequenz der Aptamer-Mutante Nr. 89-2 (58 nt) (SEQ ID NO 4)

(U = 2'-NH₂-2'-desoxyuridin; C = 2'-NH₂-2'-desoxycytidin)

5' -GGGAG ACGAU AUUCG UCCAU CACCG GACGG GACCA GAGGU
GCCGC UGUCC GACAU GGA-3'

5 5.) RNA-Sequenz der Aptamer-Mutante Nr. 89-Z (30 nt) (SEQ ID NO 5)

(U = 2'-NH₂-2'-desoxyuridin; C = 2'-NH₂-2'-desoxycytidin)

5' -ACCGG ACGGG ACCAG AGGUG CCGCU GUCCG-3'

6.) Sequenz der DNA Nr. 82 (SEQ ID NO 6)

5' -GGGAG ACGAT ATTCG TCCAT CGGGA GCAGG GAAGG GGGCC
10 GCTGT CCGAC TGAAT TCTCG ACC-3'

7.) RNA-Sequenz des Pyrimidin-modifizierten Aptamers Nr. 82 (SEQ ID NO 7)

(U = 2'-NH₂-2'-desoxyuridin; C = 2'-NH₂-2'-desoxycytidin)

5' -GGGAG ACGAU AUUCG UCCAU CGGGA GCAGG GAAGG GGGCC
GCUGU CCGAC UGAAU UCUCG ACC-3'

15 8.) RNA-Sequenz des Kernbereichs des Pyrimidin-modifizierten Aptamers Nr. 82 ohne flankierende Sequenzen (SEQ ID NO 8)

(U = 2'-NH₂-2'-desoxyuridin; C = 2'-NH₂-2'-desoxycytidin)

5' -GGGAG CAGGG AAGGG GGC-3'

9.) RNA-Sequenz der Aptamer-Mutante Nr. 82-Z (30 nt) (SEQ ID NO 9)

20 (U = 2'-NH₂-2'-desoxyuridin; C = 2'-NH₂-2'-desoxycytidin)

5' -UCGGG AGCAG GGAAG GGGGC CGCUG UCCGA-3'

BEISPIEL 3: Kultivierung von humanen Endothelzellen aus Nabelschnur-Venen (HUVEC)

Lösungen (steril) :

Kulturmedium: IF-Basalmedium + 15% (v/v) NCS, 5 µg/ml Transferrin, 5
5 µg/ml Heparin, 0,7 µg/ml FGF, 2 mM L-Glutamin [IF-Basalmedium: 1:1-Mischung aus Iscove's Modifiziertem Dulbecco Medium (IMDM) und Ham's F12, beide von Life Technologies, Paisley (England)]

NCS: Serum neugeborener Kälber (Sebak, Aidenbach)

FGF: Fibroblastenwachstumsfaktor (eigene Herstellung, partiell
10 aufgereinigt aus Schweinehirn)

Materialien :

Zellkulturgefäße, gelatiniert

Durchführung :

Die Kultivierung von HUVEC erfolgt in gelatinebeschichteten
15 Kulturgefäßen bei 37°C, 5% CO₂ und Wasserdampf-gesättigter Luftatmosphäre. Das Kulturmedium wird alle 2-3 Tage gewechselt; bei Konfluenz werden die Zellen mit einer Teilungsrate von 1:3 bis 1:5 passagiert. HUVEC wachsen streng kontaktinhibiert und bilden einschichtige Zellrasen mit der typischen Kopfsteinpflastermorphologie. Bei Konfluenz erreichen die Kulturen Zelldichten
20 von $4-9 \times 10^4$ Zellen/cm². Für Apoptoseuntersuchungen werden ausschließlich HUVEC-Kulturen der Passagen 1-4 verwendet.

Beschichtung von Kulturgefäßen:

Lösungen (steril) :

Gelatinelösung, 1% (w/v) in Milli-Q-Wasser

25 1 g Gelatine (zellkulturgetestet) in 100 ml Milli-Q-Wasser suspendieren, durch Autoklavieren für 20 min bei 121°C und 2 bar lösen und bei Raumtemperatur lagern.

PBS (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄)

8 g/l NaCl

0,2 g/l KCl

1,44 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$

0,2 g/l KH_2PO_4

Die Salze in einem entsprechenden Volumen Milli-Q-Wasser lösen, 20
5 min bei 121°C und 2 bar autoklavieren und bei Raumtemperatur lagern. Der pH-Wert wird überprüft und liegt zwischen 7,2 und 7,4.

Materialien :

Zellkulturgefäße

Durchführung :

10 Für die Kultivierung adhärent wachsender Zellen werden Kulturgefäße mit Gelatine beschichtet. Der Boden der Zellkulturgefäße wird mit steriler Gelatinelösung bedeckt, die Zellkulturgefäße werden 15 min bei Raumtemperatur belassen. Die Gelatinelösung wird abgesaugt, die Zellkulturgefäße werden einmal mit PBS gewaschen und können so verwendet werden.

15 **Subkultivierung adhärenter Zellen**

Lösungen (steril):

PBS

Trypsin/EDTA (0,05% (w/v)/0,02% (w/v))

0,1 ml Trypsin-Stammlösung

20 0,05 ml EDTA-Stammlösung

Mit sterilem PBS auf 50 ml auffüllen, und in Portionen zu 10 ml bei -20°C lagern.

Materialien:

Zellkulturgefäße, gelatiniert

25 **Durchführung:**

Alle aufgeführten Zelltypen werden mit Trypsin/EDTA-Lösung von der Kulturfläche abgelöst. Das Kulturmedium wird abgesaugt, der Boden des Kulturgefäßes kurz mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA-Lösung (~1 ml

für eine 25 cm²-Kultur-flasche) bedeckt. Die Enzymlösung wird sofort wieder abgesaugt, so dass ein dünner Flüssigkeitsfilm auf den Zellen verbleibt. Die Zellen werden 1-10 min bei Raumtemperatur belassen und das Ablösen der Zellen unter dem Mikroskop verfolgt. Das Ablösen der Zellen kann durch sanftes
5 Aufschlagen des Kulturgefäßes auf der Kante beschleunigt werden. Die Zellen werden in frischem Kulturmedium aufgenommen, eventuell gezählt und in neue Kulturgefäße ausgesät.

10 **BEISPIEL 4:** Bestimmung der Apoptoserate durch Färbung apoptotischer Zellen mit DAPI

DAPI gehört zur Indolfarbstoffgruppe und ist ein selektiver DNS-Farbstoff. Der Farbstoff wird bei 340-360 nm angeregt, und das Emissionsmaximum liegt bei 480 nm. Er wird für Apoptoseuntersuchungen
15 eingesetzt [vgl. Cohen et al., Immunology Today, 14, NO. 3, 126-130 (1993)].

Morphologische Auswertung:

Lösungen:

PBS

Formaldehydlösung

20 4% (v/v) Formaldehyd in PBS

DAPI-Lösung (Molecular Probes, Leiden, Niederlande)

2 µg/ml DAPI in Methanol

Materialien:

Petrischale (35 mm) oder 24-Loch-Platte mit HUVEC-Zellen in Kultur

25 **Durchführung:**

Der Kulturüberstand einer Petrischale oder 24 Loch Platte wird abgesaugt, der Zellrasen wird 15 Minuten mit 1 ml Formaldehydlösung auf Eis fixiert, zweimal mit 2 ml PBS gewaschen, für 15 Minuten mit 0,5 ml DAPI-Lösung versetzt, mit PBS gewaschen und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Es wird mit dem UV-Filtersatz und einem 20 x oder 40 x Objektiv gearbeitet. 500-1000 Zellen werden zufällig ausgewählt und die Zellen mit apoptotischen Kernen gezählt.

Der Apoptose-Index wird nach folgender Formel berechnet:

5
$$\text{Apoptose-Index [\%]} = \text{Anzahl apoptotischer Zellen} / \text{Gesamtzellzahl} \times 100$$

BEISPIEL 5: Testsystem für anti-apoptotisch wirksame Aptamere

Die Zellen werden wie in **Beispiel 3** beschrieben kultiviert. Die Zellen
10 werden in die entsprechenden Kulturgefäße (z.B. 24-Lochplatte/0,5 ml pro Kavität) ausgesät und nach dem Erreichen der vollständigen Konfluenz für den eigentlichen Test eingesetzt.

Die Induktion der Apoptose erfolgt durch das von den Endothelzellen selbst produzierte und sekretierte TSP-1, welches sich im Kulturmedium
15 anreichert (Auto-Konditionierung des Kulturmediums).

Es werden Untersuchungen zum Einfluss der verschiedenen Aptamere auf die Apoptoserate von Endothelzellen durchgeführt. Hierfür werden die Aptamere, die in DEPC-behandeltem bidestillierten Wasser gelöst sind (**Beispiel 1**) in dem Kulturmedium für HUVEC (**Beispiel 3**) verdünnt und in den angegebenen
20 Konzentrationen eingesetzt. Als Positivkontrolle wird Kulturmedium ohne jegliche Aptamere oder Inhibitoren eingesetzt.

Das Medium mit den Aptameren wird zu den Zellen gegeben und für drei Tage unter Kulturbedingungen (**Beispiel 3**) inkubiert. Nach 36 Stunden wird das Kulturmedium/ Kulturmedium mit Aptameren einmal gewechselt.

25 Anschließend werden die Zellen wie in **Beispiel 4** beschrieben zur Bestimmung der Apoptoserate mit DAPI gefärbt und der Apoptose-Index nach der angegebenen Formel bestimmt.

Die deutliche Apoptose-induzierende Wirkung des auto-konditionierten Mediums im Falle der Positivkontrolle und die reduzierte Apoptose im Falle der
30 Inhibitionskontrolle zeigen als interne Kontrollen ein Gelingen des Testes an.

BEISPIEL 6: Identifikation von anti-apoptotisch wirksamen Aptameren mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens

5 Die Zellen werden wie in **Beispiel 3** beschrieben kultiviert. Die Zellen werden in die entsprechenden Kulturgefäße (z.B. 24-Lochplatte/0,5 ml pro Kavität) ausgesät und nach dem Erreichen der vollständigen Konfluenz für den Test nach Beispiel 4 eingesetzt. Folgende Proben werden angesetzt:

10 (K) Kulturmedium [auto-konditioniertes Medium, Basisrate der Apoptose, Kontrolle],

(1) Kulturmedium + Aptamer 89, SEQ ID NO 2, Konzentration: 150 nM

(2) Kulturmedium + Aptamer 89, SEQ ID NO 2, Konzentration: 300 nM

(3) Kulturmedium + Aptamer 82, SEQ ID NO 7, Konzentration: 150 nM

(4) Kulturmedium + Aptamer 82, SEQ ID NO 7, Konzentration: 300 nM

15 Nach 72 h Inkubation unter Kulturbedingungen werden die Zellen fixiert, mit DAPI gefärbt und morphologisch unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die apoptotischen Zellen und die Gesamtzellzahl werden bestimmt und der Apoptoseindex berechnet (Prozent apoptotischer Zellen) (**Beispiel 3, Beispiel 4, Beispiel 5**).

20

Tabelle 1: Es werden folgende Aptamere getestet. Die dazugehörenden Sequenzen sind in Beispiel 2 angegeben:

PROBE NO	Aptamer-Bezeichnung, Konzentration	Apoptose -index [%]	Inhibitions -index [%]*
K	Kontrolle	$3,59 \pm 0,54$	--
(1)	89, 150 nM	$0,17 \pm 0,15$	95,24
(2)	89, 300 nM	$0,16 \pm 0,14$	95,65
(3)	82, 150 nM	$1,22 \pm 0,27$	66,03
(4)	82, 300 nM	$0,74 \pm 0,19$	79,32

5 * 100% = keine Apoptose mehr detektierbar; 0% = keine Wirkung = Kontrolle

10 **BEISPIEL 7:** Identifikation der minimierten Sequenz der anti-apoptotisch wirksamen Aptamere durch Verkürzung

Der Test wurde wie in **Beispiel 6** beschrieben durchgeführt. Dabei wurden ein Aptamer mit der reduzierten Gesamtlänge (SEQ ID NO 4, hier genannt "89-2") mit dem Aptamer 89 (volle Länge SEQ ID NO 2, genannt "89") verglichen.

15 Auch bei SEQ ID NO 4 bildet sich – wie in Figur 1 dargestellt – die thermodynamisch bevorzugte Hairpin-Struktur H1 aus. Dagegen wurde die bei SEQ ID NO 2 am 3'-Ende vorhandene Sequenz 5'-UGAAUUCUCGACC-3' bei SEQ ID NO 4 ersetzt durch die RNA-Sequenz 5'-AUGGA-3' (modifizierte RNA, siehe **Beispiel 2**). Dadurch wird die Struktur der "Helix F" zerstört, und es kann
20 eine neue kurze Helix entstehen (5'-AUGGA/5'-UCCAU).

Die Zellen werden wie in **Beispiel 3** beschrieben kultiviert. Die Zellen werden in die entsprechenden Kulturgefäße (z.B. 24-Lochplatte/0,5 ml pro Kavität) ausgesät und nach dem Erreichen der vollständigen Konfluenz für den Test eingesetzt (**Beispiel 4, Beispiel 5**). Folgende Proben werden angesetzt:

25 (K) Kulturmedium [auto-konditioniertes Medium, Basisrate der Apoptose, Kontrolle],

(5) Kulturmedium + Aptamer 89, SEQ ID NO 2, Konzentration: 50 nM

(6) Kulturmedium + Aptamer 89,-2 SEQ ID NO 4, Konzentration: 50 nM

Die folgende Tabelle 2 faßt die Ergebnisse zusammen. Es ist deutlich zu

erkennen, daß der verkürzte Sequenzbereich in Nr. 89-2 (SEQ ID NO 4) eine zur Ursprungssequenz Nr. 89 (SEQ ID NO 2) vergleichbare Aktivität aufweist.

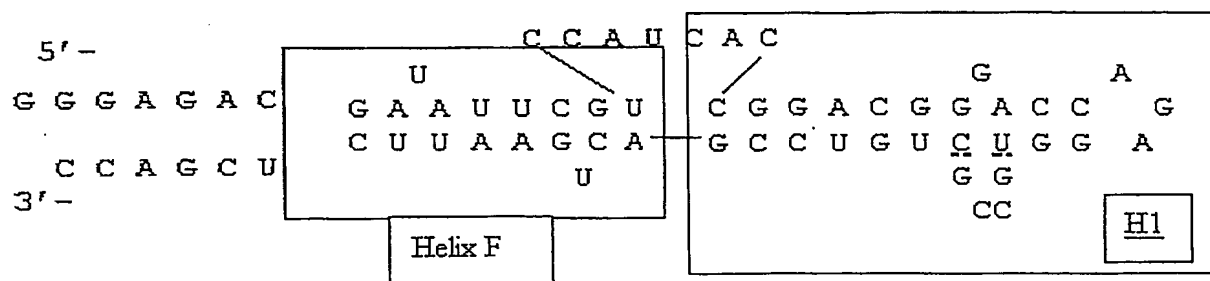
- 5 **Tabelle 2:** Es werden folgende Aptamere getestet. Die dazugehörenden Sequenzen sind in Beispiel 2 angegeben:

PROBE NO	Aptamer-Bezeichnung	Apoptose -index [%]	Inhibitions -index [%]*
K	Kontrolle	$4,99 \pm 0,59$	--
(5)	89	$0,44 \pm 0,21$	91,15
(6)	89-2	$0,81 \pm 0,30$	83,76

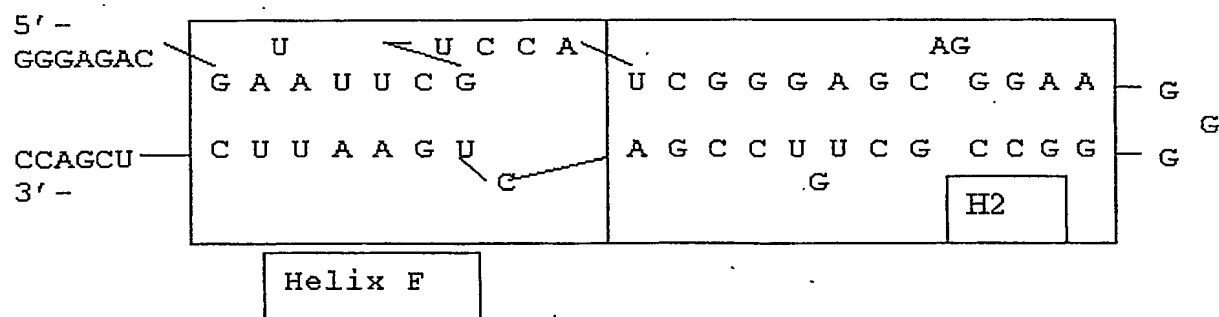
* 100% = keine Apoptose mehr detektierbar; 0% = keine Wirkung = Kontrolle;

PATENTANSPRÜCHE

1. Nukleinsäure umfassend eine Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: SEQ ID NO 1 bis SEQ ID NO 9, welche anti-apoptotisch wirksam ist und funktionelle Varianten dieser Nukleinsäure.
2. Nukleinsäure nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass sich an die Sequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: SEQ ID NO 1 bis SEQ ID NO 9 in 5'- und/oder 3'-Richtung nicht mehr als 100, bevorzugt nicht mehr als 70, besonders bevorzugt nicht mehr als 30 Nukleotide, ganz besonders bevorzugt nicht mehr als 20, und am meisten bevorzugt nicht mehr als 10 Nukleotide anschließen.
3. Nukleinsäure ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO 1 bis SEQ ID NO 9.
4. Pharmazeutische Zubereitung umfassend eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3.
5. Verwendung der Nukleinsäuren nach Anspruch 1 bis 3 zur Herstellung eines Medikamentes zur Behandlung von Erkrankungen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: Arteriosklerose, Wunden, Förderung der Wundheilung insbesondere bei schwerheilenden Wunden, AIDS, Krebs, Alzheimers Erkrankung systemischer Lupus erythematosus sowie die rheumatoide Arthritis und weitere chronisch-entzündliche Erkrankungen.
6. Verwendung der Nukleinsäuren nach Anspruch 1 bis 3 als Diagnosetool.
7. Verfahren zur Herstellung der Nukleinsäuren nach Anspruch 1 bis 3 durch chemische Synthese.



Figur 1



Figur 2

SEQUENZPROTOKOLL

<110> CytoTools GmbH

<120> Anti-apoptotisch wirksame Aptamere

<130> C 720

<160> 9

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 66

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Aptamer

<400> 1

gggagacgat attcgtccat caccggacgg gaccagaggt gccgctgtcc gactgaattc 60

tcgacc 66

<210> 2

<211> 66

<212> RNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> modifizierte Base

<222> (1)..(66)

<223> Aptamer; U = 2'-NH₂-2'-desoxyuridin; C = 2'-NH₂-2'-desoxycytidin

<400> 2

gggagacgau auucguccau caccggacgg gaccagaggu gccgcugucc gacugaauuc 60

ucgacc 66

<210> 3

<211> 21

<212> RNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> modifizierte Base

<222> (1)..(21)

<223> <220>

<223> Aptamer; U = 2'-NH₂-2'-desoxyuridin; C = 2'-NH₂-2'-desoxycytidin

<400> 3

accggacggg accagaggug c

21

<210> 4
<211> 58
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<221> modifizierte Base
<222> (1)..(58)
<223> Aptamer; U = 2'-NH₂-2'-desoxyuridin; C = 2'-NH₂-2'-desoxycytidin

<400> 4
gggagacgau auucguccau caccggacgg gaccagaggu gccgcugucc gacaugga 58

<210> 5
<211> 30
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<221> modifizierte Base
<222> (1)..(30)
<223> Aptamer; U = 2'-NH₂-2'-desoxyuridin; C = 2'-NH₂-2'-desoxycytidin

<400> 5
accggacggg accagaggug ccgcuguccg 30

<210> 6
<211> 63
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Aptamer

<400> 6
gggagacgat attcgtccat cgggagcagg gaagggggcc gctgtccgac tgaattctcg 60
acc 63

<210> 7
<211> 63
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<221> modifizierte Base
<222> (1)..(63)
<223> Aptamer; U = 2'-NH₂-2'-desoxyuridin; C = 2'-NH₂-2'-desoxycytidin

<400> 7
gggagacgau auucguccau cgggagcagg gaagggggcc gcuguccgac ugaauucugc 60

acc

63

<210> 8
<211> 18
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<221> modifizierte Base
<222> (1)..(18)
<223> Aptamer; U = 2'-NH₂-2'-desoxyuridin; C = 2'-NH₂-2'-desoxycytidin

<400> 8
gggagcaggg aagggggc 18

<210> 9
<211> 30
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<221> modifizierte Base
<222> (1)..(30)
<223> Aptamer; U = 2'-NH₂-2'-desoxyuridin; C = 2'-NH₂-2'-desoxycytidin

<400> 9
ucgggagcag ggaagggggc cgcuguccga 30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte if Application No
PCT/EP2004/014097

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/11 C12Q1/68 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12Q A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBL, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02/083160 A (CYTOTOOOLS GMBH) 24 October 2002 (2002-10-24) the whole document	1-7
A	WO 01/33218 A (CYTOTOOOLS GMBH; FREYBERG, MARK, ANDRE; FRIEDL, PETER; KAISER, DIRK) 10 May 2001 (2001-05-10) page 4, line 15 - line 28; examples 9-13	1-7
A	WO 02/26932 A (DUKE UNIVERSITY) 4 April 2002 (2002-04-04) cited in the application the whole document	1-7
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 April 2005

Date of mailing of the international search report

02/05/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mandl, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter

Application No

PCT/EP2004/014097

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>FREYBERG M A ET AL: "Proatherogenic flow conditions initiate endothelial apoptosis via thrombospondin-1 and the integrin-associated protein" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 286, no. 1, 10 August 2001 (2001-08-10), pages 141-149, XP002324346 ISSN: 0006-291X cited in the application abstract</p>	1-7
A	<p>CERCHIA L ET AL: "Nucleic acid aptamers in cancer medicine" FEBS LETTERS, vol. 528, no. 1-3, 25 September 2002 (2002-09-25), pages 12-16, XP004383225 ISSN: 0014-5793 abstract</p>	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter

Application No

PCT/EP2004/014097

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 02083160	A	24-10-2002	DE	10109136 A1	12-09-2002
			WO	02083160 A2	24-10-2002
			EP	1368052 A2	10-12-2003
			US	2004101526 A1	27-05-2004
WO 0133218	A	10-05-2001	DE	19952960 A1	10-05-2001
			AT	263972 T	15-04-2004
			AU	1517401 A	14-05-2001
			DE	50006011 D1	13-05-2004
			WO	0133218 A1	10-05-2001
			EP	1226433 A1	31-07-2002
			EP	1512412 A1	09-03-2005
			JP	2003536049 T	02-12-2003
WO 0226932	A	04-04-2002	AU	9630501 A	08-04-2002
			CA	2425208 A1	04-04-2002
			EP	1330544 A2	30-07-2003
			WO	0226932 A2	04-04-2002
			US	2003175703 A1	18-09-2003

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter es Aktenzeichen
PCT/EP2004/014097

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N15/11 C12Q1/68 A61K48/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12N C12Q A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBL, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 02/083160 A (CYTOTOOOLS GMBH) 24. Oktober 2002 (2002-10-24) das ganze Dokument	1-7
A	WO 01/33218 A (CYTOTOOOLS GMBH; FREYBERG, MARK, ANDRE; FRIEDL, PETER; KAISER, DIRK) 10. Mai 2001 (2001-05-10) Seite 4, Zeile 15 - Zeile 28; Beispiele 9-13	1-7
A	WO 02/26932 A (DUKE UNIVERSITY) 4. April 2002 (2002-04-04) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-7

-/--

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

13. April 2005

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

02/05/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Mand1, B

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	FREYBERG M A ET AL: "Proatherogenic flow conditions initiate endothelial apoptosis via thrombospondin-1 and the integrin-associated protein" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Bd. 286, Nr. 1, 10. August 2001 (2001-08-10), Seiten 141-149, XP002324346 ISSN: 0006-291X in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung	1-7
A	CERCHIA L ET AL: "Nucleic acid aptamers in cancer medicine" FEBS LETTERS, Bd. 528, Nr. 1-3, 25. September 2002 (2002-09-25), Seiten 12-16, XP004383225 ISSN: 0014-5793 Zusammenfassung	1-7

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter:

s Aktenzeichen

PCT/EP2004/014097

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 02083160	A	24-10-2002	DE	10109136 A1	12-09-2002
			WO	02083160 A2	24-10-2002
			EP	1368052 A2	10-12-2003
			US	2004101526 A1	27-05-2004
WO 0133218	A	10-05-2001	DE	19952960 A1	10-05-2001
			AT	263972 T	15-04-2004
			AU	1517401 A	14-05-2001
			DE	50006011 D1	13-05-2004
			WO	0133218 A1	10-05-2001
			EP	1226433 A1	31-07-2002
			EP	1512412 A1	09-03-2005
WO 0226932	A	04-04-2002	JP	2003536049 T	02-12-2003
			AU	9630501 A	08-04-2002
			CA	2425208 A1	04-04-2002
			EP	1330544 A2	30-07-2003
			WO	0226932 A2	04-04-2002
			US	2003175703 A1	18-09-2003